

彼とする請求項1乃至29のいずれか1項記載の単子葉植物の形質転換方法。

【請求項31】 単子葉植物がイネ科植物であることを特徴とする請求項1乃至30のいずれか1項記載の単子葉植物の形質転換方法。

【請求項32】 単イネ科植物がイネまたはトウモロコシであることを特徴とする請求項1乃至31のいずれか1項記載の単子葉植物の形質転換方法。

【請求項33】 単イネ科植物がイネであることを特徴とする請求項1乃至32のいずれか1項記載の単子葉植物の形質転換方法。

【請求項34】 単イネ科植物がトウモロコシであることを特徴とする請求項1乃至33のいずれか1項記載の単子葉植物の形質転換方法。

【発明の詳細な説明】
技術分野
本発明は、単子葉植物の形質転換方法に関する。

背景技術
単子葉植物の形質転換方法としては、従来より、エレクトロポレーション法、ポリエチレングリコール法 (PEG法)、パーティキュラール法その他が知られている。

エレクトロポレーション法は、プロトプラストと目的のDNAを混合し、電気刺激で細胞膜に穴を開けることによりDNAを細胞内に導入し形質転換を図る方法である。この方法で導入した遺伝子が単子葉植物、特にイネに導入されている (Toriyama K. et al., 1988; Biotech. 6:1072-1074; Shimamoto K. et al., 1989; Nature 338:274-276; Rhodes C.A. et al., 1988; Science 240:204-207)。

しかしながら、この方法は、1) プロトプラストからの単子葉植物系が確立されている植物種のみで適用可能である。2) プロトプラストから個体再生までには数か月を要するので、形質転換体を得るのに時間がかかる。3) 培養期間が長期化するので、それに伴う培養費の増大が高くなり、正常な形質転換体を得る頻度が低くなる、という問題点を有する。

PEG法は、目的遺伝子とプロトプラストとを混合し、PEGで処理することによって遺伝子の導入を図る方法であり、エレクトロポレーション法とは電気刺激がPEGに変わらな点で異なる。導入効率はエレクトロポレーション法よりはるかに低いと考えられる。この方法で形質転換した植物は再生はするものの、広く用いられているとは言い難い。プロトプラストを用いるため、エレクトロポレーション法と同様に問題点を持つ (Zhang W. et al., 1988; Theor. Appl. Genet. 76:835-840; Datta S.K. et al., 1990; Biotech. 8:736-740)。

また最近、強い感染処理をしたトウモロコシ未熟胚およびカルスに電気刺激によって遺伝子を導入する方法が報告された (D' Hailluin K. et al., 1992; Plant Cell 4:1495-1505)。導入された遺伝子の存在は再分化植物体においても確認されている。しかし、まだこの方法で

の形質転換の成功例は一例のみである。

パーティキュラール法は、目的の遺伝子を微細な金属粒子に付着させ、金属粒子を高速度で細胞あるは組織に撃ち込むことにより形質転換を行わせる方法である。従って、原理的にはあらゆる組織を対象に形質転換を行なうことができ、特にプロトプラストからの再生系が確立されていない植物種に有効であるとされている。

今までにトウモロコシではタイプIIカルス (Armstrong C.L. and Green C.E., 1985; Planta 164:207-214) の材料にパーティキュラール法により形質転換を行ない、そこから正常な特性を有する形質転換体を得た報告がいくつかある (Gordon-Kamm W.J. et al., 1990; Plant Cell 2:603-618; Fromm M.E. et al., 1990; Biotech. 8:833-839; Walters D.A. et al., 1992; Plant Mol. Biol. 18:189-200; Vain P. et al., 1993; Plant Cell Rep. 12:84-88)。

しかし、これらの報告のほとんどは、培養容易性の品種を材料として使用しており、また、あらゆる品種に適用できる技術には至っていない。

Vasiliらはパーティキュラール法によるコムギのエンバリオジェニックスカルスにバスタ、ピアラフォス等の除草剤の主成分であるホスフィノスリンをアセチル化するbar遺伝子 (Thompson C.J. et al., 1987; EMBO J. 6:2519-2523) とQ5遺伝子を導入し、バスタ抵抗性のカルスおよび再生植物体を得た。これらのカルスおよび再生植物体における、導入遺伝子の産物である酵素の活性を確認し、またbar遺伝子が存在することをサザン分析で確認した (Vasili V. et al., 1992; Biotech. 10:667-674)。

いにはパーティキュラール法によってイネの未熟胚およびエンバリオジェニックスカルスにハイグロマイシン抵抗性遺伝子を導入し、ハイグロマイシンまたはピアラフォス抵抗性再生植物体を得た。この植物体でのハイグロマイシン抵抗性遺伝子の存在をサザン分析で確認した。この後代の子のハイグロマイシン抵抗性は3:1の分離が見られた (Li L. et al., 1993; Plant Cell Rep. 12:230-235)。

Christouらはパーティキュラール法によってイネの未熟胚にbar、ハイグロマイシン抵抗性遺伝子およびQ5遺伝子を導入し、ハイグロマイシンまたはピアラフォス抵抗性でQ5活性を示す植物体を得て、導入遺伝子の存在をサザン分析によって確認した (Christou P. et al., 1991; Biotech. 9:957-962)。

Kozielecらはパーティキュラール法によってトウモロコシ未熟胚にbar遺伝子とR因子を導入し、ホスフィノスリン抵抗性植物体を得た。この植物体はホスフィノスリンの合成と、サザン分析により導入遺伝子の存在が確認された (Kozielec M.G. et al., 1993; Biotech. 11:194-200)。

その他の方法としては、1) 種子、胚とDNAの共存培養 (Topfer R. et al., 1989; Plant Cell 1:133-139; Led

oux L. et al., 1974; Nature 249:17-21)。2) 花粉管への処理 (Luo and Wu, 1988; Plant Mol. Biol. Rep. 6:165-173) リポソーム法 (Caboche M., 1990; Physiol. Plant. 79:173-176; Gad A.E. et al., 1987; Theor. Appl. Genet. 75:30-36) があるが、形質転換の効率、再現性、あるいは汎用性に関して問題があり、一般的な方法とは言えない。

一方、アグロバクテリウム属細菌のTiプラスミドをベクターとして用いた遺伝子導入法は、タバコ、ペチュニア、ナタネ等の双子葉植物の形質転換法として普遍的に用いられている。しかしながら、アグロバクテリウム属細菌の宿主は双子葉植物のみに限られ、単子葉植物には寄生しないといわれている (De Cleene M., 1976; Bot. Rev. 42:389-466)。

アグロバクテリウムによる単子葉植物の形質転換に関してはアスバラガス (Beyebier B. et al., 1987; Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84:5345-5349)、そしてヤム (Dioscorea bulbifera) (Schaefer, et al., 1987; Nature 327:529-532) で報告されているが、その他の単子葉植物、特にイネ科植物にはこの方法を適用できないといわれている (Potrykus I., 1990; Biotechnology 8:535-543)。

GrimsleyらはアグロバクテリウムのT-DNAの中にトウモロコシトリックウイルス (Maize streak virus) のDNAを導入したものをトウモロコシ生長点に接種したところ、トウモロコシトリックウイルスの感染を確認したことを報告している。トウモロコシトリックウイルスのDNAを接種しただけではこのような感染症状が認められないことから、上の菌株はアグロバクテリウムがトウモロコシにDNAを導入するところであることを示すものと解釈している (Grimsley et al., 1987; Nature 325:177-179)。しかし、ウイルスは核ゲノムに組み込まれなくても増殖する可能性があるため、この結果はT-DNAが核に組み込まれたことを示すものではない。その後、感染効率はトウモロコシの茎頂の生長点に接種したときが最も高く (Grimsley et al., 1988; Biotech. 6:185-189)、感染にはアグロバクテリウムのプラスミドのvir遺伝子が必須であることを示した (Grimsley et al., 1989; Mol. Gen. Genet. 217:309-316)。

Coulthはトウモロコシの生長点に針で傷をつけた後カナマイシン抵抗性遺伝子とQ5遺伝子を持った感染原性アグロバクテリウムBMMを接種し、処理後の生長点をカナマイシンで選別したところ、抵抗性を示す植物体を得た。この後代の種子が導入した遺伝子を持つことを確認するためサザン分析を行ったところ、一部の種子で導入遺伝子が確認された (Coulth J. et al., 1991; Plant Cell 3:951-954; 426-434)。このことはアグロバクテリウム処理された生長点からカナマイシン選別により得られた植物体には形質転換細胞が非形質転換細胞が混在していることを示す (キメラ現象)。

Mooneyらは、アグロバクテリウムを用いた小麦の胚に

カナマイシン抵抗性遺伝子の導入を試みる。まず、胚を酵素で処理し、細胞壁に傷をつける処理をし、その後アグロバクテリウムを接種した。処理したカルスのうち極めて少数のカナマイシン抵抗性と思われるカルスが確認されたが、このカルスから植物体の再生はできなかった。また、カナマイシン抵抗性遺伝子の存在をサザン分析で確認したところ、全ての抵抗性カルスで導入遺伝子の増殖が認められた (Mooney P.A. et al., 1991; Plant Cell 1:215-218)。

Rathnerらはイネの胚に傷をつけた後、感染原性のアグロバクテリウムA281 (pT180542) をイネの8品種に処理したところ、日本晴、緑坂5号の2品種で胚腐敗の組織の増殖がみられた。さらに、T-DNAからホルモン合成遺伝子を除いたTiプラスミドにカナマイシン抵抗性遺伝子とQ5遺伝子を挿入したプラスミドを持つアグロバクテリウムをイネの胚に接種したところカナマイシン抵抗性カルスの増殖がみられた。この抵抗性カルスではQ5遺伝子の発現が認められたが、形質転換植物体を得ることはできなかった。これらのことから、アグロバクテリウムのT-DNAがイネの細胞に導入されたと解釈している (Rathner et al., 1990; Biotech. 8:333-338)。

このように、イネ、トウモロコシ、コムギ等のイネ科の作物でもアグロバクテリウムによる遺伝子導入が可能であることを示唆する研究報告が現れてきているが、何れも再現性に問題があるほか、導入した遺伝子の複製について不完全で、認得できる結果が示されていない (Potrykus I., 1990; Biotech. 8:535-543)。

Chenらは2,4-D共存で2日間培養したイネ未熟胚に付着した、ジャガイモ腫瘍培養細胞を含む培地中でopt II遺伝子とQ5遺伝子を持ったアグロバクテリウムを接種した。処理した未熟胚をG418培地上で培養したところ誘導されたカルスから再分化植物体を得られた。再分化植物体およびその後代の植物体でのQ5遺伝子の存在をサザン分析で確認したところ、再分化世代、後代いずれの植物体でも導入遺伝子の存在が認められたことを報告している (Qian W.T. et al., 1993; Plant Mol. Biol. 22:491-506)。この結果は、アグロバクテリウムによるイネの形質転換を支持するものであるが、形質転換率は1.0%と非常に低く、供試した未熟胚数500に対し、正常な生長を示した再生植物体は1個体に過ぎなかった。イネの未熟胚を抽出するには多大な労力を要するため、このように低い形質転換効率では実用的なレベルにあるとは言い難い。

発明の要旨

上述のように、イネ科作物における遺伝子導入法は、エレクトロポレーション法およびパーティキュラール法が主流である。エレクトロポレーション法の場合、プロトプラストを用いるため、再生植物を得るまで長期を要し、多大な労力がかかり、また長期の培養により高頻度で感染体が出現するという危険性がある。また、この

方法はプロトプラストからの再分化系が確立されていない作物、例えばトウモロコシには適用できない。細胞をプロトプラストにしない程度の酵素処理をした未熟胚に電気刺激により高圧子導入を行なう方法 (D. Hattin et al., 1992) も報告されているが、まだ成功例は一例のみであり、今のところ一般的な手法とは言い難い。そこで、上述のように、トウモロコシに対しては、ダイブIIカルゲンあるいは未熟胚を用いたパーティクルガン法が試みられている。パーティクルガンを用いた場合、形質転換体が得られる可能性は高いが、パーティクルガンという特別な装置が必要であり、この装置には形質転換は不可能である。また微細な金属微粒子の噴射による、葉緑体に対する危険性も考えられる。またトウモロコシに対しては、生息点組織にアグロバクテリウムを感染させることが試みられている (Gould J. et al., 1991)。しかし生息点を感染する作業は多くの労力が必要で、大量に調製することは必ずしも容易ではない。また本発明者らがこの手法によってトウモロコシ形質転換体の作出を試みたが、形質転換体は得られなかった (後述)。

従って、本発明の目的は従来の方法に比較して、形質転換から植物体の再生までの時間が短く、プロトプラストからの植物体の再生が確立されていない植物に対しては、も一般的に適用することができ、特殊な装置を必要とせず、さらに用いる材料の調製が容易な単子葉植物の形質転換方法を提供することである。

本発明者らは、アグロバクテリウムで処理する単子葉植物の植物組織、アグロバクテリウムの処理条件、及びハイナリーベクターの構成等が遺伝子導入効率に及ぼす影響等を鋭意研究した結果、単子葉植物の脱分化処理に用いない未熟胚をアグロバクテリウム属細菌を用いて脱分化に高い効率で形質転換ができること、そしてこの方法には再現性があり、これによれば上記目的を達成することができるとを見出し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、所望の遺伝子を含むアグロバクテリウム属細菌で単子葉植物の脱分化処理していない未熟胚の胚盤を形質転換することから成る、単子葉植物の形質転換方法を提供することである。

本発明の方法により、イネ、トウモロコシ、コムギ、オオムギ等のイネ科植物を始めとする単子葉植物の目的の外来遺伝子を再現性良く導入することが初めて可能になった。アグロバクテリウムを用いた単子葉植物の形質転換方法はこれまでにもあるが、前述のとおり確立された方法とは言い難い。しかし、本発明ではこれまで用いられていない脱分化処理していない未熟胚に本発明で改良した方法でアグロバクテリウムを接種することにより、極めて容易に遺伝子を導入することができた。本発明の方法では材料調製が容易な未熟胚を用いるので、生息点を用いる従来技術に比べて供試材料を容易に得ることができ、また、形質転換は未熟胚の胚盤になされる

ため、プロトプラストを形質転換する場合に比べて植物体再生までの時間が短く、変異の頻度が低下する。また、スーパーハイナリーベクターを用いれば、トウモロコシや一部のイネ品種のように培養が困難な品種にも高い効率で遺伝子を導入することが可能である。

図面の簡単な説明

図1は、本発明の方法に用いることができるアグロバクテリウム属細菌に含まれるプラスミドの一例であるpTOK162の構造と本発明の実施例で用いたプラスミドpTOK32の構造を示す図である。

図2は、図1と同様にpRSUの構造とプラスミドpSRI11の構造を示す図である。

本発明を実施するための最良の形態
本発明の方法により形質転換される単子葉植物は、特に限定されるものではなく、イネ、トウモロコシ、オオムギ、コムギ、アスパラガスその他、いかなる単子葉植物にも適用可能である。もともと、イネ、トウモロコシ、オオムギ及びコムギ等を包摂するイネ科植物が好ましく、とりわけトウモロコシが好ましい。

本発明において、未熟胚とは受粉後の発芽過程にある未熟種子の胚を言う。また、本発明の方法に供される未熟胚のステージ (熟期) は特に限定されるものではなく、受粉後いかなる時期に採取されたものであってもよい。もともと、受粉後2日以後のものの方が好ましい。また、後述の形質転換後、後述の方法により、脱分化し、正常な個体を再生する能力を有するカルスを誘導できる未熟胚胚盤を用いることが好ましい。また、未熟胚はインプレッド、インプレッド間のFL、インプレッドと自然受粉品種間のFL、市販品種の未熟胚であることが好ましい。

また、本発明において、脱分化処理とは、植物組織の分化した細胞を脱分化培地において培養し、無秩序に増殖するカルス等の未分化状態の細胞塊を得るための処理である。

形質転換に用いられるアグロバクテリウム属細菌は、Tiプラスミド又はRiプラスミドを持つ、従来より双子葉植物の形質転換に用いられているものを用いることができる。これらのものの多くはA. tumefaciens (Ti) 属細菌由来のTiプラスミドのヴィルレンス領域 (vir) 領域) 由来のDNA領域を含むベクターを有しており、植物に付与しようとする形質を担う遺伝子はこのベクター中に挿入され、またこのベクターとは別のプラスミド中に存在し、相同組織等に由来するTiプラスミド中にin vivoで挿入されるものである。また、小飼らは、A. tumefaciens A281という強病原性の、形質転換効率が高くて高い株 (Hood E. E. et al., 1984; Hotech, 2:702-709, Hood E. E. et al., 1986; J. Bacteriol. 168:1283-1290, Komari, T. et al., 1986; J. Bacteriol. 166:88-94, Jin, S. et al., 1987; J. Bacteriol. 169:4417-4425, Komari, T., 1989; Plant Science 60:223-229, ATCC3734

9) に含まれるTiプラスミドpTi180542のヴィルレンス領域 (vir) 領域) 由来のDNA領域を含むベクター (本発明者において、このベクターをスーパーハイナリーベクターと呼ぶことがある) を用いた (特開4-223527号)。本発明では、このようなスーパーハイナリーベクターを好ましく用いることができる。

このようにスーパーハイナリーベクターの例としてpTOK162 (特開4-222527号) を挙げることができる。その他の例として、このプラスミドは、大腸菌およびA. tumefaciens 中で増殖可能であるpTOK154と呼ばれるプラスミド (Ti) プラスミドから誘導された

公知のpCA472プラスミドとpTOK101と呼ばれる公知の宿主プラスミドから後述の方法により構築された。Ti領域を含むプラスミド (pTi180542) のヴィルレンス領域由来の脱分化にクロロニ化されている上記15.3kbのベクター (Kori断片 (virB, virC, virD, virE, virF) を組み込んだものである。このpTOK154には、Ti領域の2つの境界配列とその間に単子葉植物に導入しようとする遺伝子としてハイナリーベクターが配列されており、この例は、単子葉植物に導入しようとする遺伝子がpTi180542のヴィルレンス領域由来のクロロニ化されたDNA断片を含む。有するプラスミド中に配置されている例である。

単子葉植物に組み込まれようとする所望の遺伝子は、上記プラスミドのTi-DNA領域中の制限酵素部位に常法により組み込むことができ、プラスミドが有する薬剤耐性等の適当な選択マーカーに基づいて選択することができる。もともと、図1に示すpTOK162のように、大型多数の制限部位を持つものは、通常のサブクローニングの手法では所望のDNAをTi領域内に導入することが必ずしも容易でないことがある。このような場合にはA. tumefaciens 細胞内でのin vivo系での相同組織換え (Herrera-Estrella, L. et al., 1983; EMBO J. 2:987-995, Horsch, R. H. et al., 1984; Science 223:496-498) を利用することにより、目的のDNAをpTOK162に導入することが可能になる。すなわち、例えば、まず、pTOK162をさらに所望DNAを導入したpR322と呼ばれるプラスミド (類似のプラスミドを含む) を導入する。pTOK162のDNAにはpR322と相同な部分があるため、pR322誘導体は相同配列を介して組織換えによりpTOK162に組み込まれることになる。pR322はpTOK162と異なりA. tumefaciens 中で複製できないので、このような組み込まれた状態 (pTOK162::pR322誘導体) であることができない。A. tumefaciens 中で生存することができない。そして、pTOK162とpR322誘導体の各々に特異的な322誘導体を有するA. tumefaciens 形質転換体を得ることができ、さらに、pTOK162を有するA. tumefaciens 各種のプラスミドを導入して研究したところ、pR322誘導体の選択マーカーとしては、トランスポ

ゾンTm7 (De Greve, H. H. et al., 1981; Plasmid 6:235-248) 由来のスペースバクテリウム耐性遺伝子 (Sp) が複製されていることが判明した。従って、すでに所望の遺伝子がpR322にクロロニ化されている場合には、Sp遺伝子をそのプラスミドに挿入すれば、A. tumefaciens 形質転換のspの相同組織換えにより、pTOK162のTi領域に所望の遺伝子を導入することができる。またその他の場合には、pR322由来のDNAとSp遺伝子から構成されるプラスミドを用意して、これに所望の遺伝子を導入する方法も考えられる。この際、Ti領域の境界配列を利用すれば、最終的に、pTOK162上において、ハイナリーベクターと所望の遺伝子を別々のTi領域中に配置することも可能である。ハイナリーベクターと所望の遺伝子を同時に組織換えした場合、両Ti領域とも導入される場合は相当の比率で生じるわけであるので、目的遺伝子の導入は十分達成できる。また、両Ti領域が別々の脱分化に組み込まれる場合もあり得るので、後に目的の遺伝子をハイナリーベクターから分離することも可能となる。

寄生となるアグロバクテリウム属細菌としては、特に限定されないが、A. tumefaciens 形質転換を好ましく用いることができる。

プラスミドをA. tumefaciens 形質転換等のアグロバクテリウム属細菌に導入する操作は従来法により行うことができる。例えば、細菌の三系交配法 (Ohtaka et al., 1980; Pro. Natl. Acad. Sci. USA 77:7347-7351) により行うことができる。

このようにして調製されるアグロバクテリウム属細菌には、pTOK162由来のヴィルレンス能力の高いDNAが含まれるので、高い効率で単子葉植物の形質転換を行うことが可能である。

尚、本発明においては、単子葉植物に導入しようとする遺伝子は、従来の技術と同様にTi領域の境界配列の間に配置されるものであるが、アグロバクテリウム属細菌中で、Tiプラスミド上に配置されてもよく、または他のプラスミド上に配置されてもよい。

アグロバクテリウム属細菌で単子葉植物の未熟胚を形質転換する方法は、未熟胚をアグロバクテリウム属細菌と中に接種することにより行うことができる。例えば、4-Dとの共存培養等の脱分化処理を行っていたが、本発明者らはこの脱分化処理が必要であることを見出した。よって、本発明の方法は、従来の方法に比べて簡便であるという利点を有する。さらに、植物によっては、

特にトウモロコシでは、形質転換処理の前に脱分化処理を行うと、形質転換率が低下するので、このように植物では、前処理を行なう本発明の方法により形質転換効果を高めることができる。また、従来、アグロバクテリウム属菌で植物を形質転換する際に、感染効率が高くなるように、植物に傷をつけるが、感染処理に相応する程度感染してからアグロバクテリウム属菌を感染させていた。本発明の方法では、このような前処理を行ってもよいが、本発明者らは、このような前処理を行わなくても効率良く形質転換が行えることを見出し、特に、トウモロコシの場合には、付着する形質転換後カルスへ誘導する効率が低下するので、このような前処理を行わないことが好ましい。

形質転換した未熟胚は、その後、公知の方法 (Green, C.E. and Phillips, R.L., 1975; Crop Science 15:417-421; Duncan, D.R. et al., 1985; Planta 165:322-332) により脱分化され、脱分化後で形質転換細胞の増殖、増殖を行うことが好ましい。選抜は、前記所望の遺伝子の発現に基づいて行うことができる。脱分化状態の細胞は、正常個体再生能力を有するカルスであることが好ましい。形質転換細胞からの植物体の再生は公知の方法 (Lu, protio, E. and Luserdi, H.C. 1988; Maydica XXXII:163-177) により行うことができる。これにより所望の形質を獲得した植物体、好ましくは、所望の形質を獲得し、正常遺伝性を有する形質転換植物体を再生することができ、なお、これらの具体的操作の一例が下記実施例に詳述されている。

実施例

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もともと、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

(1) 供試組織の調製

(i) トウモロコシの品種
トウモロコシ品種P3732, A188, H94, 837Hc, MoJ2Hc, W117Hc, Oh43, H99, W64A Hc rhm, Fl (A188 x B1ac k Mexican Sweet), F1 (A188 x B73Hc), F1 (B73Hc x A188), Fl (A188 x A188), Fl (MoJ2Hc x A188), Fl (C103 x A188) を材料として決定した。P3732は抽出糖農協同組合より入手。全てのインプレッド及びB1ack Mexican Sweetのいずれの品種も農林水産省生物資源研究所から入手した。

(ii) イネの品種

日本品種、月の光を選定して供試した。

(iii) トウモロコシ基質組織の調製

重塩酸ナトリウムに5分間浸漬後滅菌水で3回洗浄した。洗浄後、組織塊 (LS主要組織、L線量重量 11mg malier E. and Skoog F. 1965; Physiol. Plant. 18:100-112) 7)、0.5mg/mlニコチン酸、0.5mg/1ミリトキニン酸、1mg/1ミリアミン地酸、100mg/1ミリイノシントール、

100mg/1mgガザミノ酸、700mg/1mgプロリン、20mg/1mg糖、2.3g/1gアルイト)に浸漬し25℃、照明下で培養した。約4日後、発芽した幼苗から頂端分生組織を含む約0.1x0.3mmの組織を切り出し材料とした。

(iv) トウモロコシ未熟胚の調製
花粉受粉後約14日目に雌雄から長さ1~2mmの未熟胚を無菌的に単離した。

(v) イネ未熟胚の調製
開花後、7~12日目の未熟種子を篩を除去した後、70%エタノールに30秒、1%次亜塩素酸ナトリウムに10分間浸漬することにより消毒した後、未熟胚を取り出し供試材料とした。

(2) Tiプラスミド
ハイグロマイシン抵抗性遺伝子 (HPT)、ホスフィノスリン (PPT) 抵抗性遺伝子 (bar) およびQ5遺伝子をTiプラスミドのT-DNA領域に組み込んだ。以下のプラスミドを作成した。

(i) pIC21Hm:
ヒマのカタラーゼ遺伝子の第1イントロンを含むQ5遺伝子と、ハイグロマイシン抵抗性遺伝子と連結したプラスミド (中村ら, 1991; 植物バイオテクノロジー-II (現代化学増刊, pp.123-132), 名古屋大学、中村氏より入手)。

(ii) pICQ32:
(a) イントロンQ5およびハイグロマイシン抵抗性遺伝子の中間ベクター-pICQ29への導入

た。

(b) スーパーバイナリーベクター-pICQ162への導入
スーパーバイナリーベクターに強顕原性アグロバクテリウムA28由来のvirB, virC, virD遺伝子を挿入して得たスーパーバイナリーベクター-pICQ162への目的遺伝子 (ハイグロマイシン抵抗性遺伝子、イントロンQ5遺伝子) の導入は相同組換えによって行なった。すなわち、両ベクターは大腸菌プラスミドp8323に由来する部位を保持つて、スベクチノマイシン、カナマイシンで選抜された菌は両プラスミドの組換えによって生じたプラスミドのみが含まれることとなる。スーパーバイナリーベクターにハイグロマイシン抵抗性遺伝子、イントロンQ5遺伝子が組み込まれたプラスミドをpICQ32と呼ぶ (図1参照)。

なお、図1及び後述の図2において、「SP」はスベクチノマイシン抵抗性遺伝子、「HPT」はハイグロマイシン抵抗性遺伝子、「PPT」はカナマイシン抵抗性遺伝子、「TC」はテトラサイクリン抵抗性遺伝子、「BAR」はホスフィノスリン抵抗性遺伝子、「IG」はイントロンQ5遺伝子、「OR」はT-DNAの右ボーダー配列、「B」はT-DNAの左ボーダー配列、「virB, virC, G」は強顕原性アグロバクテリウムA28由来のvirB領域、「ORI」はコピの複製開始点、「COS」はラムファージのCOS部位、「K」は制限酵素Kpn I部位、「H」は制限酵素Hind III部位を示す。

(iii) pS8131

(a) pS8131の構築

pICQ70をBamH IおよびBgl IIで切断後、pS1318とした。pS1318をEcoR IおよびAseIで切断し、T4 DNAポリメラーゼ処理後、Sal Iリンカー (5'-GTCGAC-C-3') を挿入し閉鎖しpS131を作成した。pS131をSal Iで切断し、この部位に、pC4643 (An et al., Plant Molecular Biology Manual A3:1-19, Kluwer Academic, Dordrecht, 1998) のT-DNAを含む4.7kbのSal I断片を導入しpICQ235を作成した。pICQ235をSac II部位で切断し、T4 DNAポリメラーゼにより平末端化後、Hind IIIリンカー (5'-GACCTTCG-3') を挿入し閉鎖し、得られたプラスミドをpICQ46と命名した。pICQ46をHind IIIおよびEcoR Iで切断し、T-DNA中の大部分のDNAを除去した後、35Sプロモーターにホスフィノスリンセチルトランスフェラーゼ遺伝子 (特許平1-503434) を複製した遺伝子 (bar) を付する。さらに、pS825をHind IIIで切断し、pICQ235より単離した、35SプロモーターとイントロンQ5を含む3.1kbのHind III断片を挿入しpS831を作成した。すなわち、pS831は、T-DNA領域中に、植物中で発現するイントロンQ5遺伝子とホスフィノスリン耐性遺伝子 (bar) を含む中間ベクターである。

(b) pMR1の構築

pQC101 (Knauf et al., Plasmid 8:45-54, 1982) をEcoR Iにより切断し、T4 DNAポリメラーゼ処理後閉鎖することによってEcoR I部位を創設した。さらに、Bgl IIで切断後閉鎖する操作を行ったところ、Bgl II部位が創設できたので、このプラスミドをpQC101と命名した。pQC101をHind IIIとXho Iで切断し、Hind III-Sal Iで切断したpC18と結合しpICQ30を作成した。pICQ30をHind IIIで切断し、T4 DNAポリメラーゼ処理後EcoR Iリンカー (5'-GCCAATTCG-3') を挿入し閉鎖することにより、Hind III部位をEcoR I部位に変換し、pICQ239とした。pC4642をHpa Iで切断し、Xho Iリンカー (5'-GTCGACG-3') を挿入し閉鎖してpICQ36を作成した。pICQ36をXba IおよびEcoR Iで切断し、2.7kb断片を除去し、pICQ36の2.7kb Xba I-EcoR I断片を挿入し閉鎖してpMR1を作成した。pMR1は、アセプターベクターの1種であり、T-DNAを含む中間ベクターと組込んでハイブリッドベクターを作成した場合、ヘルパープラスミドと組合わせることにより、スーパーバイナリーベクターを構成することができる。

(c) pS813の構築

pMR1をKpn Iで切断し、pT180542 (American Type Culture Collection受託番号37349) のAgarlanus領域のvirB領域を含む15.2kb Kpn I断片を挿入して閉鎖してpS81とした。pS81は、アセプターベクターの一種であり、これに、T-DNAを含む中間ベクターと組込んでハイブリッドベクターを作成した場合、ヘルパープラスミドと組合わせることにより、スーパーバイナリーベクターを構成することができる。

(d) pS8131のpS81への導入

pICQ32の場合と同様に、pS831を相同組換えによってpS81に導入することによってpS8131を作成した (図2参照)。

(3) 寄生アグロバクテリウム

T-DNA領域を創設した菌株、LB44404とEHA101とを寄主バクテリアとして使用した。LB44404はヘルパープラスミド (vir領域を完全な形で持つ) PAU404を有する菌株であり、American Type Culture Collectionより入手可能である (ATCC 37499)。EHA101はヘルパープラスミドのvir領域が顕著なアグロバクテリウムA28由来であり、Hood E.E. et al. 1986 (上掲) から入手可能である。

(2) 項で述べた種々のバイナリーベクターをこれら2種類のアグロバクテリウムに導入し、以下の直感を遺伝子導入用として用いた。これらのプラスミドをアグロバクテリウムに導入する方法は細胞の三次感染法 (Orta et al., 1980; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:7347-7351) によった。

LB44404 (pS8132)

LB44404 (pS8131)

EHA101 (pICQ21Hm)

表4 ハイグロマイン選抜によるトウモロコシ未熟胚の形質転換効率

実験	ハイグロマイン 選抜経過 (mg l)	ハイグロマイン 抵抗性カルス数	供試未熟胚数 (%)
1	0-30-50	5	22(23)
2	0-30-50	6	22(27)
3	0-30-100	2	19(11)

ハイグロマイン選抜は共存培養後、各濃度で2～3週間ずつ培養した。

表5 ハイグロマイン選抜による形質転換植物体の選抜効率

実験	ハイグロマイン 抵抗性カルス数	植物体 再生カルス数	GUS + 植物体数
1	64	11	5
2	15	8	7
3	20	3	2

表6 PPT 選抜による形質転換効率

実験	供試 未熟胚数	増殖 未熟胚数 (%)	再分化 未熟胚数 (%)	GUS + 植物体数 (%)
1	364	200(55)	71(20)	44(12)
2	121	42(35)	31(26)	20(17)
3	68	28(41)	17(25)	9(13)
4	44	28(64)	9(20)	6(14)

各欄の未熟胚数および植物体数にはクロロンを含まない数

表7 再分化培地中へのPPT 添加が再分化効率および形質転換効率に及ぼす影響

PPT 添加	供試 カルス数	再分化 カルス数 (%)	再分化植物体の GUS 染色率 (%)		
			GUS -	キメラ	GUS -
+	714	335(47)	74	17	9
-	350	184(53)	40	33	27

PPT添加濃度 + : 20 mg l, - : 0 mg l

(15) トウモロコシ形質転換当代における導入遺伝子のサザン解析

形質転換体の全DNAをBamHIで切断した断片に対してba
rおよびGUS遺伝子をプローブとしたサザン法により形質
転換当代における導入遺伝子の検出を行った。いずれの
遺伝子をプローブとした場合でも供試した全ての個体で
1～数コピーの導入遺伝子の存在が認められた(表
8)。プラスミドpS8131の中ではbar遺伝子を含むBamHI
断片は2.7kb、GUS遺伝子を含む同断片は2.3kbであるの

に対し供試した全ての形質転換体には約3kb以上のバン
ドが認められた。このことはbar、GUSの高遺伝子とも相
互に検出されたDNA断片の長さは由来の違う個体では全て
異なった。これはトウモロコシの染色体への遺伝子導入
箇所がそれぞれ異なることを示すものであり、植物体内
でのバクテリアの残存によるものではないことが確認さ
れた。

表8 サザン解析による形質転換当代における導入遺伝子のコピー数

形質転換個体 (当代)	導入遺伝子コピー数	
	b a r	G U S
対照	-	-
転換体 1	2	2
2 a	2	1
2 b	2	1
3	2	1
4 a	2	1
4 b	2	1
5	2	2
6	3	1
7	2	1
8	2	2
9 a	1	1
9 b	1	1
10	1	1

(16) p10K233を導入したトウモロコシの次世代における導入遺伝子の発現と分析
と非形質転換植物を交配して得られた次世代植物の葉をQIS染色したところQIS陽性と陰性の比は、ほぼ1:1に分離し予想された分離比に適合した(表9)。

表9 ハイグロマイシン選抜によるトウモロコシ形質転換個体の次世代における導入遺伝子の発現

形質転換個体	次世代個体数	
	G U S 発現	
対照 転換体 1 1 2	陽性	陰性
	0	5
	4	5
	5	6

(17) p5831を導入したトウモロコシの次世代における導入遺伝子の発現
対照品種の葉をQIS染色したところ全て陰性であったのに対し、形質転換植物を自殖して得られた次世代の葉は1個体を除き全て陽性を示した。さらにこれらの植物体にバスタを塗布したところ対照品種の葉は約2週間で全て枯死したが形質転換次世代の葉はQIS陽性を示した個体を除き全て健全であった(表10)。QIS遺伝子の発現、PTI抵抗性ともに2因子分離に適合する遺伝的分離を示した。次に対照品種より採取した未熟胚をPPT含有培地で培養したところ全ての未熟胚が増殖を抑制されカ

表10 PPT選抜によるトウモロコシ形質転換個体の次世代における

導入遺伝子の発現（幼苗での検定）

形質転換個体	次世代個体数			
	コピー数		PPT抵抗性	
	bar	GUS	抵抗性	GUS
対照	-	-	0	50
転換体21	2	2	49	1

表11 PPT選抜によるトウモロコシ形質転換個体の

次世代における導入遺伝子の発現（未熟胚による検定）

形質転換個体	次世代未熟胚数		
	PPT抵抗性		
	抵抗性	感受性	
対照	0	76	
転換体31	29	32	
32	22	25	

(18) p5015を導入したトウモロコシの次世代における導入遺伝子のサザン解析
表10に示した形質転換個体No.21を自殖して得られた次世代植物からDNAを抽出し同様の方法でサザン法による導入遺伝子の検出を行った。植物体でのGUS遺伝子の発現が陽性、PPT感受性であった個体を除き、全ての個体でいずれの遺伝子もプロンプトした場合でも導

表12 サザン解析による形質転換次世代における

導入遺伝子のコピー数

形質転換個体 (次代)	導入遺伝子コピー数	
	bar	GUS
対照	-	-
21-1	1	1
-2	2	2
-3	1	1
-4	1	1
-5	0	0
-6	1	1
-7	1	1
-8	2	2
-9	1	1
-10	2	2
-11	1	1

(19) イネ未熟胚への接種

トウモロコシ未熟胚を材料としたときと同様に、イネ M404 (pT0G32) を用いた場合に顕著に高い効率であるLB未熟胚においても高率でGUS遺伝子の発現が認められ、* 遺伝子の発現が認められた(表13)。

表13 イネ未熟胚へのGUS遺伝子導入効率

菌系	GUS+の組織数/処理組織数 (%)
無処理	0 / 50 (0)
EHA101(pIG21Hm)	66 / 198 (33)
LB4404(pT0K232)	52 / 52 (100)

この実験で使用した2種類のバイナリーベクターはア 50 グロバクテリウムの細胞の中ではGUS遺伝子は発現しな

(19)

特許3329819

37

いことから、共存培養後のQIS遺伝子を指標とした場合、アグロバクテリウムはトウモロコシおよびイネの細胞に遺伝子を導入できることが確認された。

(20) イネ形質転換植物体の選抜

イネ未熟胚において、50mg/lハイグロマイシン添加培地上で低抗性カルスの選抜を行ったところ、スーパーハイナリーで低抗性カルスが得られた(表14)。これら高い効率で低抗性カルスが得られた(表14)。これは、選抜マーカーを含む植物体再生培地に移植することにより、容易に再生植物体が得られた(表14)。また、10株の効率的にイネ未熟胚から形質転換植物が得られることが本実施例において明らかとなった。

表14 イネ未熟胚における形質転換体の選抜結果

菌系	組織数 (%)			選抜薬剤
	供試未熟胚	抵抗性カルス	植物体再生カルス	
無処理	40	0 (0)	0 (0)	HYG
ERA101(pIG121Hm)	71	3 (4)	1 (1)	HYG
LBA4404(pTOK232)	77	23 (30)	17 (22)	HYG

HYG : ハイグロマイシン

(21) イネ形質転換植物体における導入遺伝子の確認
LBA4404 (pTOK232) をイネ未熟胚に処理することにより得られた任意かつ独立な形質転換植物3個体について、導入遺伝子の存在を確認(PCR法)により調べた。QIS遺伝子およびpTOK232のプライマーには構造領域の両端を用いた。対照として非形質転換体のDNaseおよび各遺伝子を有するプラスミドDNAを用いた。その結果、LBA4404 (pTOK232) を処理することにより得られた形質転換植物で、対照のプラスミドにのみ認められるのに対し、3個体ともpTOK232の1.1kbの増幅断片が検出された。また、QIS遺伝子についてもすべての個体で対照プラスミドと同様の1.8kbの増幅断片が検出された。非形

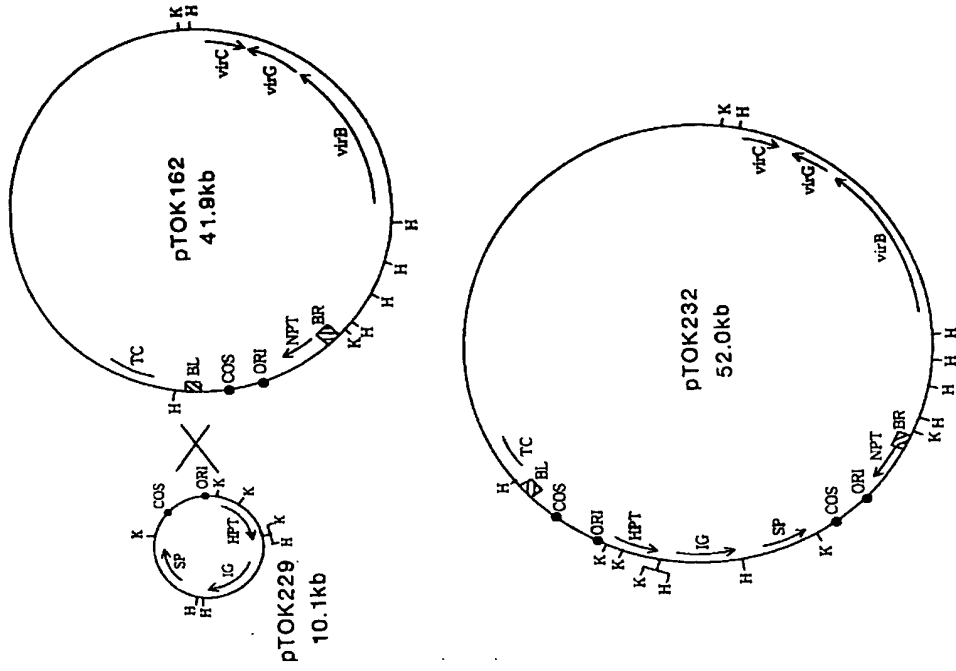
質転換体ではこれらの断片は検出されなかったことから、供試植物体はアグロバクテリウムにより導入された遺伝子を有する形質転換植物体であることが確認された。

産業上の利用可能性

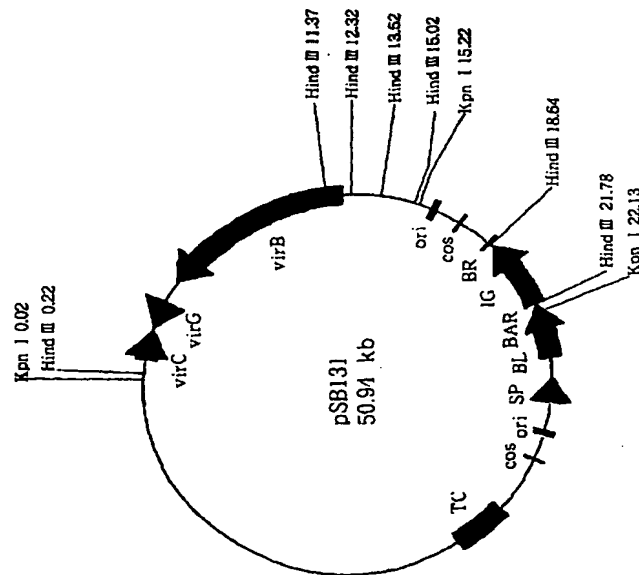
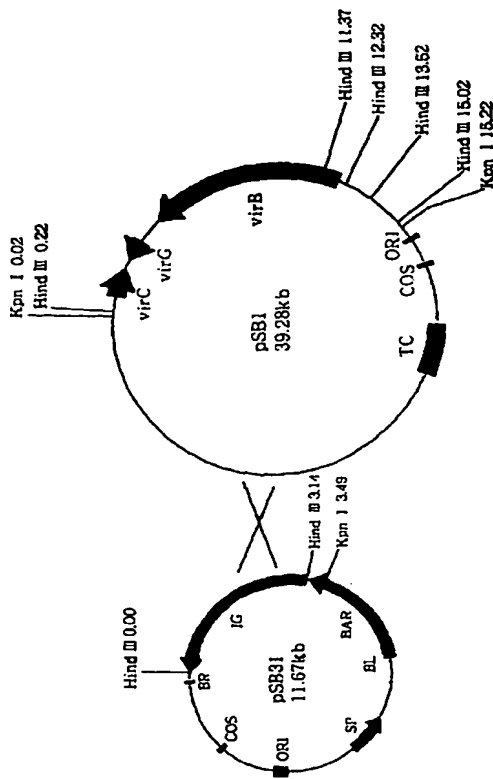
上述のように、本発明の方法は、従来の方法に比較して、形質転換植物体の再生までの時間が短く、プロトプラストからの植物体の再生が確立されていない植物に対して普遍的に適用することができ、特殊な装置を必要とせず、さらに用いる材料の調達が容易な単子葉植物の形質転換方法であるので、本発明は、有用な性質を有する単子葉植物の育種に利用可能である。

(20)

【第1図】



フロントページの続き



審査官 高尾 栄二

(56)参考文献 特開 平4-222527 (J.P., A)
Plant Mol. Biol., V
ol. 22, No. 3 (1993.) p. 491
-506
Plant Cell, Vol. 4,
No. 1 (1992) p. 7-16
Plant Cell, Tissue
and Organ Culture,
e, Vol. 25, No. 3 (19
Plant Cell, Vol. 4,
No. 12 (1992) p. 1495-1505

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A01H 1/00

C12N 15/84

BIOISIS/WPI (DIALOG)

CA (STN)